

高产蛋白酶芽孢杆菌的选育及其在大豆活性肽制备中的应用

于长青 赵学明 姚琨 张日俊

(中国农业大学 动物科学技术学院,北京 100094)

摘要 为降低抗生素替代品——大豆活性肽绿色饲料添加剂的生产成本,采用紫外线与亚硝基胍(NTG)多重诱变的方法选育芽孢杆菌 CAU208,以提高产蛋白酶能力。结果显示:15 W 紫外灯最适照射时间 3 min,距离 30 cm;亚硝基胍最适质量浓度为 1 mg/mL,且效果好于前者,两者复合诱变比单一诱变效果好。将诱变选育的蛋白酶高产菌株 No. 111 用于液态发酵制备大豆肽饲料添加剂,60 h 发酵液的水解度为 26.9%,比母本菌株 CAU208 的水解度 18.5%提高了 8 个百分点。如果两者达到相同的水解度(19.0%),则 No. 111 比 CAU208 的发酵周期缩短约 12 h。10 次传代实验表明该菌株遗传性能稳定。

关键词 紫外线;亚硝基胍;选育;大豆肽

中图分类号 S 816.48.7

文章编号 1007-4333(2005)01-0034-04

文献标识码 A

Mutagenesis of high yield protease spore-forming and its application in soy-peptide preparation

Yu Changqing, Zhao Xueming, Yao Kun, Zhang Rijun

(College of Animal Science and Technology, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract In order to reduce the cost of soy-peptide production, a high yield protease strain from its parent strain CAU208 was screened by treating with UV and NTG. The results showed that the optimum conditions of UV were 3 min, 30 cm, and the suitable concentration of NTG was 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, although the effects of NTG were better than UV, but the combined use of UV with NTG was better than single. At the cycle of 60h, the degree of hydrolysis (DH) of No. 111 was 26.9% and increased by 42.3% compared with CAU208. To achieve the same DH(19.0%), No. 111 fermentation cycle could shorten about 12 hours than CAU208 in producing soy-peptide. No. 111 genetic quality was proved to be stable by experiments.

Key words UV; NTG; mutagenesis; soy-peptide

多年来在动物饲料中广泛使用抗生素、激素、-兴奋剂、重金属、镇静剂等药物性添加剂,导致畜禽和水产品中药物残留严重,产品品质下降,细菌耐药性增强、耐药菌株增多,给人类安全和生态环境带来很大威胁。近年来消费者对食品安全问题更加关注,许多国家已禁用或限制抗生素的使用,并加速开发和推广新型安全高效的绿色饲料添加剂。

大豆生物活性肽的出现为开发新型绿色饲料添加剂开辟了一个新途径。大豆肽具有易消化吸收、抗氧化、降血压、降胆固醇、促进矿物质吸收和脂肪

代谢、刺激微生物生长和低过敏性^[1-5]等特性。本实验室多次试验表明大豆肽饲料添加剂对于猪、蛋鸡以及鱼类的生产性能、肉质、饲料转化率和存活率等指标都有明显的影响。目前,大豆肽主要是通过酶解法生产,由于酶的价格昂贵,使大豆肽的生产成本、市场价格较高,限制了其在畜牧业中的广泛应用。用微生物发酵法制备大豆肽,较酶解法可以降低生产成本。本研究旨在利用物理和化学诱变方法选育芽孢杆菌 CAU208,为发酵法制备大豆生物活性肽提供高效菌株。

收稿日期: 2004-08-13

基金项目: 国家高技术研究发展计划资助项目(2001AA246111)

作者简介: 于长青,硕士研究生;张日俊,副教授,通讯作者,主要从事饲料生物技术研究, E-mail: rjzhang@cau.edu.cn

1 试验材料

1) 菌株。

芽孢杆菌 CAU208, 购于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心。

2) 诱变剂。

功率 15 W 紫外灯; 亚硝基胍 (NTG) 为分析纯 (质量分数 > 97%), 瑞士 Fluka 公司生产。

3) 培养基。

激活培养基: 蛋白胨 5 g, 葡萄糖 5 g, 酵母浸粉 5 g, 磷酸氢二钾 4 g, 琼脂 13 g, 水 1 000 mL。

种子培养基: 蛋白胨 5 g, 葡萄糖 5 g, 酵母浸粉 5 g, 磷酸氢二钾 4 g, 豆粕粉 2 g, 水 1 000 mL。

分离培养基: 蛋白胨 2 g, 葡萄糖 5 g, 酵母浸粉 3 g, 磷酸氢二钾 4 g, 脱脂奶粉 7 g, 琼脂 13 g, 水 1 000 mL。

发酵培养基: 豆粕粉 100 g/L, 糖蜜 7.7 mL/L。

2 试验方法

1) 诱变方法^[6-10]。

紫外线诱变: 菌种经激活培养基和种子培养基各培养 36 h, 调节单细胞菌悬液活菌数至 $10^6 \sim 10^8$ 个/mL, 液层厚度 0.2 ~ 0.4 cm; 紫外灯功率 15 W, 照射时间 0, 1, 2, 3, 4 和 5 min, 距离 30 cm。

亚硝基胍诱变: 待处理的菌悬液 (预培养 36 h) 活菌数 $10^5 \sim 10^8$ 个/mL, 亚硝基胍终质量浓度为 0, 0.6, 0.8, 1.0 和 1.2 mg/mL, 30 °C 水域处理 30 min。

紫外线与亚硝基胍复合诱变: 待处理的菌悬液 (预培养 36 h) 活菌数 $10^7 \sim 10^9$ 个/mL, 亚硝基胍终质量浓度为 1.0 mg/mL, 30 °C 水域处理 30 min, 取亚硝基胍处理后的液层厚度 0.2 ~ 0.4 cm; 进行紫外线诱变, 紫外灯功率 15 W, 照射时间 3 min, 距离 30 cm。

2) 筛选方法。

初筛: 根据菌落在分离培养基产生的透明圈直径与菌落直径的比值, 筛选出比值大的菌株。

复筛: 初筛所得菌株经种子培养基培养, 接种于发酵培养基, 一定发酵周期后测定发酵液水解度。

3) 水解度的测定。采用茆三酮法^[11]。

3 结果与分析

3.1 诱变剂用量与诱变效果

随着紫外线处理时间的延长, 细菌致死率逐渐

增加, 但 3 min 时正变率达最大值 (表 1), 且诱变菌落形态变异较大。鉴于诱变的目的是获得高产菌株, 故选 3 min 为正式诱变处理时间。

表 1 紫外线处理时间对 CAU208 诱变效果的影响

项目	诱变时间/min					%
	0	1	2	3	4	
正变率	0	8.8	10.0	15.3	14.0	9.5
致死率	0	20.4	38.9	76.3	85.6	98.8

原菌株对 NTG 这一高效诱变剂非常敏感, NTG 质量浓度为 0.2 mg/mL 时致死率和正变率相对很低, 随着 NTG 质量浓度的增加, 致死率和正变率变化很大, 当 NTG 质量浓度为 1.0 mg/mL 时, 致死率达 98.6%, 此后变化不明显, 而此时正变率也达最大值 (表 2); 故选亚硝基胍的诱变剂量为 1.0 mg/mL。

表 2 亚硝基胍对 CAU208 的诱变效果

项目	亚硝基胍质量浓度/(mg·mL ⁻¹)							%
	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2	
正变率	0	4.3	10.5	19.8	24.6	32.6	19.1	5.7
致死率	0	30.2	48.1	67.9	81.2	98.6	99.2	98.7

3.2 紫外线和亚硝基胍诱变所得高效菌株

紫外线照射 3 min 后经初筛得到正变菌株 87 株, 亚硝基胍 1.0 mg/mL 作用后经初筛得到正变菌株 96 株, 将这 183 株正变菌株接入 100 mL/250 mL 的三角瓶发酵培养基中, 进行 2 次复筛, 测定豆粕水解液的水解度, 得到 5 株较稳定的正变菌株。这 5 株菌相对于母本的水解能力都有提高, 但亚硝基胍处理优于紫外线处理, 特别是 No. 3 菌, 在 60 h 时水解度比 CAU208 提高了 18.4%, 而 U02 提高了 10.3% (表 3)。

为获得高产菌株, 对上述 5 株菌进行如下处理: U01, U02 进行 NTG 诱变; No. 1, No. 2 和 No. 3 进行紫外线处理, 诱变所得菌株经 2 次复筛得到 2 株性能良好且稳定的菌株 No. 11 和 No. 31, 再将此 2 株菌同时进行紫外线与亚硝基胍复合诱变, 得到 3 株稳定性较好的正变株: No. 111, No. 112 和 No. 311。

表3 紫外线与亚硝基胍诱变结果比较

Table 3 Comparison of mutation results by treating with UV and NTG

诱变剂	菌株 编号	水解度		提高率/ %
		发酵 48 h	发酵 60 h	
CK	CAU208	14.2	18.5	
紫外线	U01	15.7	19.9	7.6
	U02	16.1	20.4	10.3
亚硝基胍	No. 1	16.2	20.8	12.4
	No. 2	17.2	21.3	15.1
	No. 3	17.9	21.9	18.4
紫外线 + 亚硝基胍	No. 111	19.5	26.9	45.4
	No. 112	20.8	27.5	48.6
	No. 311	18.7	25.6	38.4

注: 发酵时间为 60 h。CK 为不加任何诱变剂。

可以看出,经过 UV 和 NTG 协调作用后,菌株的水解能力明显提高, No. 112 在发酵 48 h 的水解度已

高于 CAU208 发酵 60 h 的水解度(表 3);诱变菌株使发酵周期缩短,大大降低了发酵成本。

3.3 传代稳定性

有些经人工诱变处理得到的高产突变菌株遗传基因型不稳定,易出现回复突变或产量下降等问题,故需验证其传代稳定性后,再选择连续传代后产量不下降且生产性能好的菌株用于以后的生产。

将诱变得到的 3 株高产菌接种到活化培养基上作为第 1 代,以后每隔 5 d 传代 1 次,共传 10 代,将每一代进行摇瓶发酵(250 mL 三角瓶装液 100 mL),测定发酵液的水解度,结果见表 4。可见突变株 No. 311 稳定性不好,产生突变回复现象;No. 111 和 No. 112 有较好的稳定性,且 No. 112 的生产性能好于 No. 111,但 No. 112 的发酵液黏稠,不易于发酵液后处理。从整个发酵工艺考虑,选 No. 111 为保留菌株。

表4 不同菌株传代水解度的比较

Table 4 DH of different mutant strains

菌株编号	传 代 数									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
No. 111	27.4	26.8	27.4	28.0	26.9	27.1	27.5	27.7	26.0	26.3
No. 112	28.4	27.8	26.9	27.5	29.0	27.4	28.6	28.1	27.5	28.8
No. 311	26.7	25.4	25.0	23.6	22.7	24.7	21.9	20.8	20.0	19.5

注:发酵时间为 60 h。

3.4 诱变菌落的形态变异

CAU208 初始菌株的菌落为淡黄色、隆起,中间有小圆梗,有放射纹,四周呈裂叶状。

诱变处理后突变株的菌落形态发生了很大变化,可归纳为以下 4 大类:1) 白色,低隆起,表面湿润,呈地毯绒状,边缘整齐;2) 淡蓝色,低隆起,有放射纹,边缘波浪状;3) 淡黄色,高隆起,中间低,菌落和培养基结合紧密,边缘整齐;4) 黄色,菌落小,低隆起,表面光滑湿润,边缘整齐。其中 1) 和 2) 类的变异株中几乎全部为负变株,水解能力较原菌株低很多,而 3) 和 4) 类中多数变异株为正变株,但第 3) 类的发酵液较黏稠,不易于产品的分离提纯。诱变菌落的形态变异为筛选高产菌株提供了方便。

4 讨 论

4.1 诱变剂用量与诱变效果的关系

诱变剂用量是影响诱变效果的重要因素之一,随着诱变剂用量的增加,正变率和致死率上升,有更

多的优良菌株得以存活、生长。但两者的变化规律并非同一过程的平行效应,当诱变剂用量增加到某一值时(紫外线照射 3 min,NTG 质量浓度 1.0 mg/mL),用量再增加,虽然致死率相应上升,可正变率开始下降,这给高产菌株的分离筛选带来很大困难,所以选择致死率为 76.3% 时的紫外线照射时间和致死率为 98.6% 时的亚硝基胍剂量作为诱变剂用量(表 1,2)。这比有关报道诱变剂的用量一般为菌株出现 60%~70% 的致死率时的剂量^[12] 稍微高些,这是因为不同的菌株对同一种诱变剂的敏感程度不同,即使是同一种菌、同一种诱变剂,菌的生长阶段不同,诱变效应也是不一样的。

4.2 不同诱变剂对诱变株水解蛋白能力的影响和作用机理分析

紫外线和亚硝基胍均可不同程度地提高原菌株的水解能力,但亚硝基胍诱变获得的菌株 No. 3 比紫外线获得的 U02(表 3) 效果好。这可能是因为两者的作用机制不同:紫外线的生物学效应主要是使

DNA 分子强烈吸收紫外线,从而引起 DNA 链断裂, DNA 分子内部和分子之间交联,核酸与蛋白质交联,嘧啶水合作用以及形成嘧啶二聚体,妨碍 DNA 链的正常解开与复制,从而引起生物体的基因突变或死亡;亚硝基胍则是烷基化试剂,其烷基化位点主要在鸟嘌呤 N-7 位和腺嘌呤 N-3 位,但这 2 个碱基的其他位置以及其他碱基上许多位置也能被烷化,烷化后碱基也像碱基类似物一样引起碱基配对错误^[13]。可能碱基错配更有效地改变了原菌的遗传性能,所以突变株的水解力提高的较多。复合诱变后,高产菌 No. 111 的水解力比原菌株提高了 42.3%,这是由于诱变剂的作用有累加和协同效果,经一种诱变剂作用后的基因对菌种起到了一定的驯化、诱导作用,使它对另一种作用机理不同的诱变剂更敏感,但试验证明,连续使用同一种诱变剂却不如首次的作用效果^[14],可能菌株对相同的作用方式有了抵抗性。所以不断更换诱变剂的种类比使用同一种诱变剂好,诱变剂的复合处理比使用单一诱变剂效果好。

4.3 菌株的生理状态与诱变效果的关系

菌株的生理状态与诱变效果有密切关系,例如有的碱基类似物、亚硝基胍等只对分裂中的 DNA 有效,对静止的或休眠的孢子或细胞无效;而另外一些诱变剂,如紫外线、亚硝酸、烷化剂、电离辐射等能直接与 DNA 起反应,因此对静止的细胞也有诱变效应,但是对分裂中的细胞更有效。因此本实验在诱变前将菌培养了 36 h 使微生物处于对数生长阶段,以提高诱变效率。

5 结 论

1) 紫外线和亚硝基胍均能有效改善芽孢杆菌 CAU208 的产酶能力。单因素作用时 15 W 紫外灯最适照射时间为 3 min,亚硝基胍最适质量浓度为 1.0 mg/mL,且后者的作用效果好于前者,两者复合诱变作用比单一诱变剂的效果好。

2) 用本研究所选的 No. 111 突变株发酵制备大豆肽饲料添加剂,比原菌株缩短发酵周期约 12 h,生产成本降低 20%。

参 考 文 献

- [1] Chen H M, Muramoto K. Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein[J]. *J Agric Food Chem*, 1995, 46(1): 49 - 53
- [2] 吴建平, 潘文彪. 乳源生物活性肽的研究概述[J]. *中国乳品工业*, 1999, 27(1): 12 - 15
- [3] Allen L. Calcium bioavailability and absorption: A review[J]. *Am J Clin Nutr*, 1982, 35: 783 - 808
- [4] Grimble G K. The significance of peptides in clinical nutrition[J]. *Annu Rev Nutr*, 1994, 14: 419 - 447
- [5] Samoto M, Akasaka T. Simple and efficient procedure for removing the 34kD allergenic soybean protein, GlymL, from defatted soy milk[J]. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 1994, 58(11): 2123 - 2125
- [6] 王水顺, 林进哲. 复合酶高产菌株选育的研究[J]. *药物生物技术*, 2001, 8(6): 317 - 321
- [7] Pascucci B, Versteegh A, Hoffen A V. DNA Repair of UV photoproducts and mutagenesis in human mitochondrial DNA[J]. *J Mol Biol*, 1997, 273: 417 - 427
- [8] Kumar D, Garg S, Bisaria V S. Production of methionine by a multi-analogue resistant mutant of *Corynebacterium liliun* Process[J]. *Biochem*, 2003, 38(11): 165 - 171
- [9] Gao X G, Cao S G, Zhang K C. Production, properties and application to nonaqueous enzymatic catalysis of lipase from a newly isolated pseudomonas strain enzyme microb[J]. *Technol*, 2000, 27: 74 - 82
- [10] Tan T W, Zhang M, Wang B W. Screening of high lipase producing *Candida sp.* and production of lipase by Fermentation Process[J]. *Biochemistry*, 2003, 39: 459 - 465
- [11] 赵新淮, 冯志彪. 蛋白质水解物水解度的测定[J]. *食品科学*, 1994(11): 65 - 67
- [12] 王璋, 王灼维. 微生物谷氨酰胺转氨酶高产菌株的诱变选育[J]. *微生物学通报*, 2003, 24(5): 62 - 64
- [13] 白秀峰主编. 发酵工艺学[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2003: 10 - 15
- [14] 陆文清, 李德发. 饲用酶制剂高产菌种的诱变筛选[J]. *饲料研究*, 2001(3): 6 - 9
- [15] 刘大川, 钟方旭. 大豆肽的制备工艺及经济效益估算[J]. *武汉食品工业学院学报*, 1998(4): 1 - 4